



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



1290004922

TCC/UNICAMP
D187a
FOP

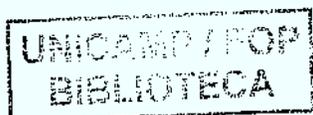
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Fernanda Chamosa D'Amore

Orientador(a): Profa Dra Brenda P F A Gomes

Ano de Conclusão do Curso: 2009



1290004922

Fernanda Chamosa D'Amore

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES
DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

***Antimicrobial action of sodium hypochlorite solutions after
different storage conditions***

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Piracicaba

2009

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
TCC/UNICAMP
D187a
Vol. _____ Ex. _____
Tombo 4922
C E
Proc. 10P-139/10
Preço ~~R\$~~ 11,00
Data 12/08/10
768100

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

D169a D'Amore, Fernanda Chamosa.
Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio em diferentes condições de armazenamento. / Fernanda Chamosa D'Amore. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.
46f. : il.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

AGRADECIMENTOS

A Professora Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela habilidade com que orientou nosso trabalho.

Ao co-orientador Francisco Montagner pela colaboração, apoio e dedicação extrema.

A Katharina Wagner pelo acompanhamento e esforço para realização deste trabalho.

A Fernanda Signoretti pela colaboração e apoio.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas, Gráficos e Figuras	1
RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
PROPOSIÇÃO.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

Tabela 1. Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a concentração da solução, temperatura de armazenamento e período de tempo	15
Tabela 2. Halos de inibição da solução de hipoclorito de sódio 2,5% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento.....	22
Tabela 3. Halos de inibição da solução de hipoclorito de sódio 5,25% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento.....	23
Tabela 4. Média do pH das soluções de hipoclorito de sódio em diferentes períodos de tempo e condições de armazenamento	25
Tabela 5. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras recém-manipuladas	26
Tabela 6. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 0,5% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil)	29
Tabela 7. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 1% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil)	31
Tabela 8. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 2,5% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil)	33
Tabela 9. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil)	34

Gráfico 1. Média dos valores de concentração de cloro ativo (mg/L) nas soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações	27
Gráfico 2. Média dos valores de pH das soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações	27
Gráfico 3. Média dos halos de inibição promovidos por soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.....	28
Gráfico 4. Médias e desvio-padrão dos valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil)	30
Gráfico 5. Médias e desvio-padrão dos valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 1,0% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba	32
Gráfico 6. Médias e desvio-padrão dos valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 2,5% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba	33
Figura 1. Preparo do inóculo: A) Placa de Petri contendo <i>E. faecalis</i> ATCC 29212. B) Contaminação do meio de cultura líquido. C) Meio de cultura contendo o inóculo. D) Espectrofotômetro para leitura dos graus de turvação. Técnica da Camada Dupla de Agar: E) Primeira camada de Muller-Hinton Agar. F) Inoculação do meio de cultura com <i>E. faecalis</i> . G) Segunda camada contendo BHI Agar e o microrganismo. H) Placa de Petri demonstrando as duas camadas de meio de cultura. Distribuição das amostras: I) Posicionamento do cilindro de metal sobre as duas camadas de meio de cultura. J) Aplicação das amostras. L) Incubação do conjunto em estufa microbiológica a 37°C, por 48-72h.	17

RESUMO

As substâncias químicas auxiliares são empregadas durante o preparo químico-mecânico com o objetivo de desinfecção do sistema de canais radiculares contaminados ou evitar a contaminação de canais com polpa viva. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação e pH de soluções de hipoclorito de sódio recém-preparadas e aquelas obtidas de consultórios odontológicos em diferentes condições de armazenamento. Os medicamentos testados foram soluções de hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%. A ação antimicrobiana das soluções foi testada frente ao microrganismo *E. faecalis* através do método da camada dupla de Agar, enquanto que o pH das mesmas foi determinado em pHmetro digital. Para o estudo, as soluções de hipoclorito de sódio recém-preparadas foram acondicionadas nas temperaturas de 8°C, em geladeira, ou de 37°C, em estufa. Foi determinada a concentração de cloro ativo das soluções recém-manipuladas e daquelas obtidas em consultórios odontológicos através do método de titulometria com iodo. De acordo com os resultados do presente estudo, as soluções de hipoclorito de sódio em baixa concentração, independente da temperatura de armazenamento são pouco efetivas, tanto em condições laboratoriais como clínicas. As soluções mais concentradas demonstraram atividade antimicrobiana variada frente ao *E. faecalis*. Entretanto, no decorrer do tempo há uma tendência à diminuição do seu potencial desinfetante. As soluções cloradas são alcalinas, variando os valores de pH entre 11,30 e 12, independentemente do tempo e das condições de armazenamento. De acordo com os resultados do presente estudo, que envolveu soluções armazenadas em condições laboratoriais e aquelas utilizadas em consultórios odontológicos, sugere-se o emprego de soluções de hipoclorito de sódio mais concentradas e aquisição em menores volumes o que permite uma renovação freqüente, garantindo uma ação antimicrobiana eficaz.

DESCRITORES

Endodontia – Hipoclorito de sódio – *Enterococcus faecalis*.

INTRODUÇÃO

O preparo químico mecânico tem por objetivo promover a limpeza e a modelagem do canal radicular, por meio do emprego de instrumentos endodônticos, de substâncias ou soluções químicas auxiliares e da irrigação – aspiração (Paiva & Antoniazzi, 1991; Schilder, 1964).

A limpeza é lograda pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos junto às paredes internas do canal radicular. Aliado a essa ação mecânica, uma ação química de limpeza é obtida pelo emprego de soluções químicas auxiliares de instrumentação. Estas soluções devem ser dotadas de propriedades solventes de matéria orgânica e de atividade antimicrobiana (Lopes & Siqueira, 2004).

A ação solvente visa à remoção de tecido de tecido pulpar vivo ou necrosado do sistema de canais mecanicamente inacessíveis aos instrumentos endodônticos. Todo tecido pulpar, mesmo vivo e não infectado, deve ser eliminado no momento do preparo do canal, para não servir de substrato a uma proliferação microbiana (Lopes & Siqueira, 2004).

A ação antimicrobiana de a solução química auxiliar deve participar da desinfecção do sistema de canais radiculares contaminados ou evitar a contaminação de canais com polpa viva (Lopes & Siqueira, 2004).

A modelagem visa à obtenção, por meio da instrumentação, de um canal radicular de formato cônico contínuo, como o menor diâmetro apical e o maior em nível coronário. Torna-se importante a preservação da trajetória do canal e a manutenção do forame apical em sua posição original durante este procedimento, sendo muitas vezes tarefas difíceis de serem alcançadas (Lopes & Siqueira, 2004).

1 SUBSTÂNCIAS AUXILIARES AO PREPARO DOS CANAIS RADICULARES

As substâncias químicas auxiliares são empregadas no interior do canal radicular com a finalidade de promover a dissolução de tecidos de tecidos orgânicos vivos ou necrosados, a eliminação ou máxima redução possível de microrganismos, a lubrificação, a quelação, de íons cálcio e a suspensão de detritos oriundos da instrumentação. Devem apresentar propriedades físicas e químicas que as qualifiquem para essas finalidades. São usadas durante a instrumentação dos canais radiculares, desempenhando ações químicas e físicas, concomitantemente, com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos. Também são usadas após a instrumentação, para remover das paredes do canal radicular a *smear layer*. Podem ser empregadas em forma de solução líquida, de creme ou de gel. Geralmente, são utilizadas em forma de soluções líquidas (Lopes & Siqueira, 2004).

As soluções irrigadoras são soluções químicas usadas na irrigação-aspiração dos canais radiculares. Sendo a irrigação-aspiração um dos processos de curta duração, é de se esperar que sua eficácia dependa mais das propriedades físicas do que das propriedades químicas das soluções empregadas. As soluções irrigadoras devem possuir pequeno coeficiente de viscosidade e pequena tensão superficial. Estes requisitos favorecem o aumento do alcance do jato, a formação da turbulência e o refluxo do líquido em direção coronária, permitindo uma maior efetividade da limpeza do canal radicular (Lopes & Siqueira, 2004).

De modo geral, uma solução irrigadora deveria apresentar elevada capacidade de umectação e poder de limpeza, capacidade antimicrobiana, ação de solvência e tolerância tecidual (Baker *et al.*, 1975; Abou-Rass & Oglesby, 1981; Fairbanks, 1995; Muora, 2003).

Várias soluções irrigadoras foram preconizadas para utilização durante o tratamento endodôntico (Pécora *et al.*, 1999). Entre as soluções mais freqüentemente empregadas estão os compostos halogenados (como o hipoclorito de sódio), os tensoativos, os quelantes, os ácidos, os peróxidos, associações e/ou misturas e outras, como a clorexidina (Estrela, 2004).

É oportuno considerar que a efetividade de uma solução depende de seu íntimo contato com as reentrâncias do sistema de canais radiculares (capacidade de umectação) E do tempo para sua ação. Neste sentido, a profundidade com que a cânula de irrigação penetra o canal, o volume e a freqüência da irrigação são aspectos que devem ser considerados (Estrela, 2004).

1.1 Hipoclorito de Sódio

O hipoclorito de sódio faz parte dos compostos halogenados, sendo que seu emprego em Odontologia iniciou-se em 1792 (Estrela, 2004).

A solução de hipoclorito de sódio tem pH elevado, em torno de 11 a 12, tornando-se mais estável, permitindo uma liberação de cloro ativo de forma mais lenta. À medida que se reduz o pH da solução, quer por meio do ácido bórico ou do bicarbonato de sódio (solução de Dausfrene), a solução fica muito instável e a perda de cloro é mais rápida. Isto significa que o tempo de vida útil da solução é pequeno. A luz solar e a temperatura elevada provocam a liberação de cloro e deixam a solução ineficaz (Estrela, 2004).

Uma das principais propriedades do hipoclorito de sódio é a sua capacidade de dissolução tecidual. Podem-se observar algumas reações químicas entre o tecido orgânico e o hipoclorito de sódio, entre as quais:

reação de Saponificação, reação de neutralização de aminoácidos e reação de formação de cloraminas. Observa-se que o hipoclorito de sódio transforma a matéria orgânica em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool) através de uma reação de saponificação (Barbin, 1999; Spanó, 1999; Pécora *et al.*, 1999).

A ação do hipoclorito de sódio em contato com matéria orgânica e a influência desta reação sobre as propriedades físico-químicas da solução foram estudados em diferentes experimentos (Barbin, 1999; Spanó, 1999; Pécora *et al.*, 1999).

O hidróxido de sódio presente no hipoclorito de sódio neutraliza aminoácidos formando água e sal e degrada ácidos graxos. Com a saída dos íons de hidroxila ocorre a redução do pH da solução remanescente. O ácido hipocloroso, quando em contato com a matéria orgânica age como solvente, libera cloro nascente que em contato com proteínas do grupo amina forma as cloraminas, efeito este conhecido como Reação de Cloraminação. O ácido hipocloroso e os íons hipoclorito apresentam ação de hidrolisar e degradar aminoácidos. O ácido hipocloroso sofre decomposição pela ação da luz, do ar e do calor, liberando cloro e, secundariamente, oxigênio nascente (Estrela, 2004).

As atividades do ácido hipocloroso (HOCl) dependem do pH. Em meio ácido ou neutro predomina a forma ácida não dissociada que é instável e mais ativa. Em meio alcalino, prevalece forma iônica dissociada (estável e menos ativa). Por esse motivo, a vida útil das soluções de hipoclorito de sódio com pH elevado é mais estável, enquanto as de pH próximo do neutro (solução de Dakin) têm vida útil muito pequena (Estrela, 2004).

A partir das reações químicas que decorrem da atividade de íons hidroxila demonstra-se a influência do hipoclorito de sódio sobre as enzimas presentes nas membranas citoplasmáticas bacterianas, justificando a sua ação antimicrobiana (Estrela, 2004).

Harrison *et al.* (1981) estudaram as propriedades antimicrobianas do hipoclorito de sódio a 2,62% e 5,25% sobre *E. faecalis* e *C. albicans*, em períodos variantes de 15 a 120 segundos. Sessenta cones de papel absorvente esterilizados foram contaminados durante 3 a 4 minutos nas suspensões microbianas. Após a contaminação, os cones foram transferidos para tubos com 10 ml das soluções teste e, posteriormente a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 segundos, cada cone foi transferido para o meio de cultura e incubado por 72 horas a 37 graus Celsius, quando se observou a presença ou não de turvação do meio. Após 45 segundos de exposição ao hipoclorito de sódio a 5,25% e, 60 segundos de exposição ao hipoclorito de sódio a 2,62%, não houve o crescimento de *E. faecalis*. *Candida albicans* foi eliminada após 15 segundos de exposição a ambas as soluções testadas.

A atividade antimicrobiana e solvente do hipoclorito de sódio depende da concentração da solução química. Estas atividades diminuem à medida que a solução é diluída, sendo a capacidade solvente mais afetada do que a antimicrobiana. Quando do uso de soluções de concentração menores, estas deverão ser renovadas no interior do canal radicular com maior frequência (Shi *et al.*, 1970; Senia *et al.*, 1975; Bloomfield *et al.*, 1979; Siqueira *et al.*, 1997; Siqueira *et al.*, 1999).

Soluções mais concentradas apresentam maior atividade antimicrobiana, desde que outros fatores, como tempo de atuação, pH, temperatura e conteúdo orgânico sejam mantidos constantes (Grossman & Meiman, 1941; Hand *et al.*, 1978; Koskinen *et al.*, 1980; Siqueira *et al.*, 1999; Spanó, 1999).

Para vários autores, existe uma relação diretamente proporcional entre a concentração da solução de hipoclorito de sódio e a velocidade de dissolução, isto é, quanto maior a concentração da solução, mais rápida a dissolução tecidual (Dychdala, 1991; Spanó, 1999). Sabe-se também que o efeito antimicrobiano e a capacidade de dissolução tecidual das soluções de

hipoclorito de sódio aumentam proporcionalmente a sua concentração, enquanto que a sua compatibilidade biológica diminuiu (Holland *et al.*, 1992).

Estrela (2000) estudou a eficácia do hipoclorito de sódio (em concentração de 1, 2 e 5%) frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e uma mistura de microrganismos. Concluiu-se que a diluição máxima de hipoclorito de sódio a 1% necessária para inibir *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi 0.1%, e a de 1% para *B. subtilis* e para a mistura de microrganismos. Todos os microrganismos foram inativados por esta solução em todos os períodos (5, 10, 15, 20 e 30).

De acordo com Estrela (2004), nas situações clínicas de polpa vital, cuja preocupação aponta para a manutenção da cadeia asséptica, o hipoclorito de sódio a 1% representa a solução de escolha. Para as situações de necrose, em que o efeito antimicrobiano deve preponderar e requerer destaque especial, em associação com a capacidade de dissolução tecidual, o hipoclorito de sódio em concentração de a 1% ou a 2,5% deve ser selecionada.

Agentes externos tais como temperatura, presença de luminosidade e condições de armazenamento parecem influenciar na manutenção e preservação das propriedades das soluções cloradas.

Berutti & Marini (1996) avaliaram através de microscopia eletrônica de varredura o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio na remoção de smear layer. Foram avaliadas soluções de NaOCl a 5% quando aquecidos a 21 graus Celsius e 50 graus Celsius. As características da smear layer formada após o preparo químico mecânico com NaOCl 5% aquecido a 50 graus Celsius mostram uma redução na espessura dessa camada, demonstrando que o aumento da temperatura promove o crescimento da cinética das moléculas do NaOCl, e favorece a ação da solução.

Gambarini *et al.* (1998) realizaram um estudo com o objetivo de investigar o efeito do hipoclorito de sódio aquecido a 50 graus Celsius na estabilidade da solução. Os resultados mostraram que todos os experimentos apresentam índices de degradação crescentes à medida que o tempo aumentava. Após 30 dias, ambas as soluções, aquecida e não aquecida, mantiveram alto conteúdo de cloreto disponível e o valor do pH consistente com excelente dissolução tecidual e propriedades. Assim, o uso de solução de hipoclorito de sódio aquecido parece ser um procedimento seguro e simples, que pode resultar em uma melhor sanificação dos canais.

No entanto, segundo Saballa & Powell (1989) os possíveis efeitos deletérios do emprego de NaOCl aquecido sobre os tecidos periodontais não foram ainda completamente elucidados.

O aquecimento de soluções de hipoclorito de sódio acelera a tendência de degradação das soluções, através da verificação da perda de íons cloro ativos, o que se soma a perda de eficiência em períodos prolongados de armazenamento (Nicoletti & Magalhães, 1996; Gambarini *et al.*, 1998).

Piskin & Turkun (1995) realizaram um estudo para avaliar os efeitos da temperatura de armazenamento, concentração, e tempo de estabilidade das soluções de hipoclorito de sódio, constatando que ocorre degradação com o tempo, entretanto, esta degradação ocorre de forma lenta. Este autor sugere que as soluções de hipoclorito de sódio são instáveis e quando empregadas para desinfecção do canal radicular devem ser preparadas no dia de seu uso.

Frais *et al.* (2001) também relata que o período de armazenamento, assim como as condições de diluição e aquecimento, pode influenciar a concentração de hipoclorito de sódio empregada, sugerindo ainda um controle criterioso no armazenamento (em temperaturas frias, num lugar escuro ou em um recipiente opaco que não sofra reação e com tampa

hermética) e diluição das soluções, para que concentrações corretas sejam atingidas.

2 *ENTEROCOCCUS FAECALIS* NO INTERIOR DOS CANAIS RADICULARES

Para um microrganismo ser capaz de colonizar e sobreviver em um canal radicular que apresente tratamento endodôntico, ele deve sobreviver aos procedimentos de desinfecção realizados na terapia endodôntica inicial e superar as privações nutricionais no microambiente (Gomes *et al.*, 1996a; Gomes *et al.*, 1996b).

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos e têm demonstrado resistência aos procedimentos endodônticos de desinfecção como o preparo químico-mecânico (Gomes *et al.*, 1996b; Sundqvist *et al.*, 1998). *Enterococcus faecalis* são freqüentemente isolados de canais radiculares com infecções endodônticas persistentes (Pinheiro *et al.*, 2003) e são isolados em pequena quantidade em dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais (Sundqvist, 1992; Gomes, 1995; Sundqvist *et al.*, 1998).

Siren *et al.* (1997) demonstraram que *Enterococcus faecalis* podem penetrar no canal pela infiltração coronária, resistir ao tratamento e persistir após a obturação dos canais. Os autores relataram que os canais que continham espécies de *E. faecalis* resultaram em maior número de casos com insucessos, necessitando de retratamento endodôntico, quando comparados com os dentes que não apresentavam essas bactérias na sua microbiota.

Kaufman *et al.* (2005) estudaram 58 dentes e identificaram *E. faecalis* em casos de retratamento endodôntico com e sem lesão periapical.

A prevalência do *E. faecalis* foi de 12%, sendo também isolados de dentes sem lesão periapical, mostrando que estas espécies não parecem ser os principais responsáveis pelo desenvolvimento de lesões periapicais.

No entanto, de acordo com Gomes *et al.* (2006), níveis superiores de detecção para este microrganismo foram obtidos com o emprego de *Nested-PCR* quando comparados às técnicas convencionais de cultura. Estes autores isolaram *Enterococcus faecalis* em 2% dos canais com infecções primárias e em 42% daqueles que se apresentavam com insucesso no tratamento endodôntico. No entanto, quando métodos moleculares foram empregados, houve um acréscimo significativo na detecção dessa espécie tanto em casos de infecções primárias quanto secundárias. Este dado suscitou a dúvida quanto à origem dos *Enterococcus* em infecções secundárias, pois os mesmos poderiam estar em baixo nível para cultivo nas infecções primárias, mantendo-se latentes e manifestando-se posteriormente em uma situação de reinfecção.

PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar a ação antimicrobiana e pH de soluções de hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%, quando armazenadas a 8°C ou 37°C, após diferentes períodos de tempo (7 dias, 14 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias); e,
2. Avaliar a ação antimicrobiana, o pH e o percentual de cloro ativo de soluções de hipoclorito de sódio coletadas de consultórios odontológicos da cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1 AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO

A metodologia empregada para a avaliação da ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio armazenadas a 8°C, a 37°C após diferentes períodos e também daquelas coletadas de consultórios odontológicos foi a Técnica da Camada Dupla de Agar, frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

1.1 Soluções obtidas comercialmente

Após a manipulação das soluções de hipoclorito de sódio, nove alíquotas de 100µL das amostras foram retiradas dos frascos para determinar os valores controle de halos de inibição proporcionados pelas substâncias, antes de receberem qualquer tratamento.

Os frascos foram então acondicionados em temperatura de 8°C, em geladeira, ou de 37°C em estufa microbiológica. Assim, nove alíquotas de 100µL foram retiradas de cada frasco após 7, 15, 30, 60 e 90 dias. As amostras foram distribuídas nos poços distribuídos sobre os meios de cultura inoculados com o microrganismo *E. faecalis*.

Tabela 1. Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a concentração da solução, temperatura de armazenamento e período de tempo.

Solução	Temperatura	Período	n
NaOCl 0.5%	8°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
	37°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
NaOCl 1.0%	8°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
	37°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
NaOCl 2.5%	8°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
	37°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
NaOCl 5.25%	8°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9
	37°C	7 dias	9
		14 dias	9
		30 dias	9
		60 dias	9
		90 dias	9

O microrganismo *E. faecalis* foi subcultivado em placas de BHIA e incubado por 18-24 h a 37°C (em atmosfera de 10% CO₂).

Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram suspensas em tubos contendo 5 mL do meio de cultura líquido apropriado. Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL). Esta forma de confecção do inóculo permite um crescimento semi-confluente do microrganismo testado.

Inicialmente foram preparadas placas contendo 40 mL de Muller Hinton Agar (MHA) que serviram de base para a camada de inóculo, que foi preparada a seguir.

Quarenta mL de Brain Heart Infusion Agar (BHIA) foram preparados e autoclavados em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingiu 45°C, ainda em estado líquido, foi adicionado 400 µL do inóculo microbiano e foi promovida agitação uniforme do conjunto. O BHIA passou a ter, portanto, 1% de inóculo microbiano, e foi então distribuído sobre a camada sólida de Muller Hinton Agar.

No interior da câmara de fluxo laminar, após a solidificação dos meios de cultura, as amostras foram colocadas sobre a superfície do agar utilizando-se pinças estéreis.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa microbiológica.

A leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada após 48 horas de incubação a 10% de CO₂. As medidas das zonas de inibição de crescimento microbiano correspondem à distância entre a superfície externa do poço contendo a substância química auxiliar e o início da região de crescimento microbiano, os quais foram medidas com auxílio de paquímetro digital (DIGIMESS Instrumentos de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

A **Figura 1** ilustra as etapas que compreendem a Técnica da Camada Dupla de Agar.

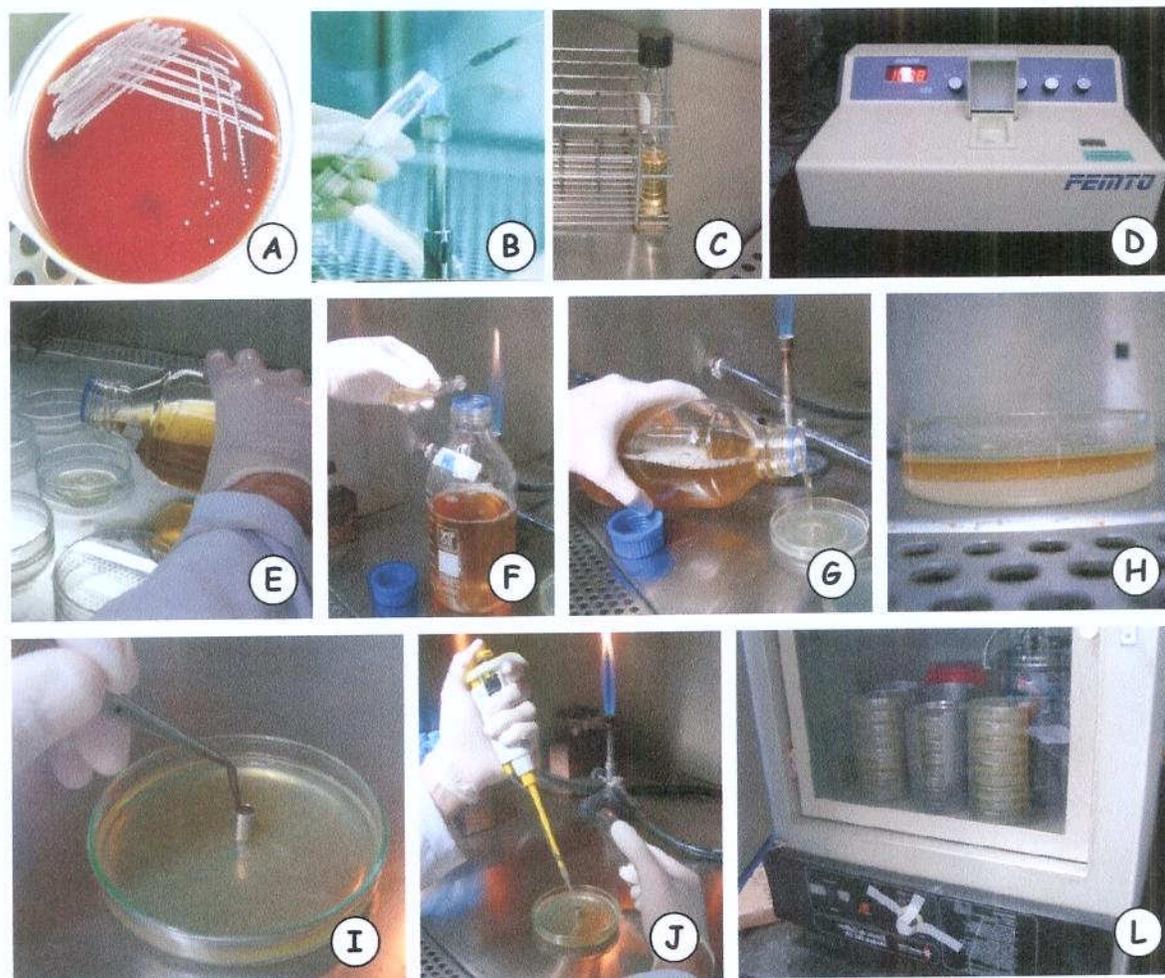


Figura 1. Preparo do inóculo: A) Placa de Petri contendo *E. faecalis* ATCC 29212. B) Contaminação do meio de cultura líquido. C) Meio de cultura contendo o inóculo. D) Espectrofotômetro para leitura dos graus de turvação. **Técnica da Camada Dupla de Agar:** E) Primeira camada de Muller-Hinton Agar. F) Inoculação do meio de cultura com *E. faecalis*. G) Segunda camada contendo BHI Agar e o microrganismo. H) Placa de Petri demonstrando as duas camadas de meio de cultura. **Distribuição das amostras:** I) Posicionamento do cilindro de metal sobre as duas camadas de meio de cultura. J) Aplicação das amostras. L) Incubação do conjunto em estufa microbiológica a 37°C, por 48-72h.

1.2 Soluções coletadas em consultórios odontológicos

Os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a análise microbiológica das amostras armazenadas em diferentes temperaturas foram utilizados para a verificação das propriedades antimicrobianas das soluções obtidas em consultórios odontológicos da cidade de Piracicaba, São Paulo (Brasil). Foi coletado um total de 30 amostras de soluções de hipoclorito de sódio. As amostras foram armazenadas em tubos tipo Falcon de 20mL, sendo estes protegidos da luz.

Procedimentos adicionais foram realizados durante a coleta das amostras com o intuito de se obter informações relativas a substância, ao seu armazenamento e ao seu tempo de uso. Os dados eram obtidos através de entrevista e anotados em um formulário, que continha os seguintes itens: a) nome do Cirurgião Dentista; b) se exercia Clínica geral ou alguma especialidade; c) substância empregada para o preparo químico-mecânico; d) concentração da solução de hipoclorito de sódio; e) data de fabricação da solução; f) data de validade da solução; g) data da coleta da solução; e, h) forma de armazenamento da solução.

2 VERIFICAÇÃO DO TEOR DE CLORO DAS SOLUÇÕES OBTIDAS NOS CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS

As soluções de hipoclorito de sódio coletadas foram então avaliadas quanto à concentração de cloro ativo, através da titulometria, de acordo com Pécora *et al.* (1988). Determinaram-se também os valores de concentração inicial de cloro das soluções recém preparadas.

Com uma pipeta volumétrica de 10 ml tomou-se uma alíquota da solução, a qual foi transferida para uma proveta graduada de 100 mL.

Acrescentou-se então 90 mL de água deionizada para diluição da amostra. Com uma pipeta volumétrica de 15 mL transferiu-se uma alíquota da solução diluída para um Erlenmeyer de 250 ml. Para a coloração da amostra adicionou-se 1 ml da solução de iodeto de potássio e 1,7 ml da solução de ácido sulfúrico 10N. Titulou-se com tiosulfato de sódio 0,1N até que a solução em questão ficasse límpida.

Para determinar a concentração de cloro, realizaram-se cálculos estequiométricos, conforme segue:

• **CÁLCULO 1:**

0,0036 g Cl_2 → 1 mL de tiosulfato de sódio.

a → Volume de tiosulfato gasto na titulação (mL).

• **CÁLCULO 2:**

15 mL → a (g de Cl_2 presentes em 15mL)

100 mL → b (Cl_2 ativo presente na solução diluição)

• **CÁLCULO 3:**

Cl_2 na solução → b x 10 (pois a solução inicial foi diluída x10).

O resultado obtido foi expresso em gramas de cloro ativo por 100 mL de solução.

2 pH DAS SOLUÇÕES

O pH das soluções de hipoclorito de sódio armazenadas a 8°C, a 37°C após diferentes períodos e também aquelas coletadas de consultórios odontológicos foi avaliado em pHmetro digital (Digimed DM 21, São Paulo, SP, Brasil).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados através do programa SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) utilizando os testes estatísticos ANOVA e Teste de Tukey ou Teste T, quando apropriado. Para o estabelecimento de correlação entre características da solução coletadas e valores de halos de inibição, pH ou concentração de cloro ativo, empregou-se o teste de Correlação de Pearson. A significância foi estabelecida ao nível de 5%.

RESULTADOS

1 AÇÃO ANTIMICROBIANA E PH DAS SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO, EM DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

1.1. Ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio

1.1.1. Hipoclorito de sódio 0,5%

A solução de hipoclorito de sódio 0,5% não produziu halos de inibição de crescimento frente ao *E. faecalis*, no período inicial e nos períodos testados quando armazenado em geladeira (8°C) ou em estufa (37°C).

1.1.2. Hipoclorito de sódio 1%

Não foram observados halos de inibição para a solução de hipoclorito de sódio 1,0% frente ao *E. faecalis*, nos período inicial e em todos os períodos testados quando armazenado em estufa (37°C). Quando armazenada a 8°C, observou-se halos de inibição bastante discretos nos períodos de 7 dias (1,71mm \pm 0,31) e 14 dias (0,86mm \pm 0,16).

1.1.3. Hipoclorito de sódio 2,5%

Quando armazenadas a 8°C, as soluções de NaOCl 2,5% produziram halos de inibição maiores nos primeiros 14 dias. Ao ser armazenada a 37°C, halos de inibição menores foram observados, no entanto pico de ação antimicrobiana foi constatado aos 30 e 60 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Halos de inibição da solução de hipoclorito de sódio 2,5% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento*.

		TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO							
		8°C				37°C			
INICIAL	1,75	± 0,54	B	-	1,75	± 0,54	A	-	
7 DIAS	2,72	± 0,57	A	a	0,00	± 0,00	B	b	
14 DIAS	2,87	± 0,48	A	a	1,60	± 0,14	A	b	
30 DIAS	0,69	± 0,04	C	b	2,06	± 0,25	A	a	
60 DIAS	0,00	± 0,00	C	b	0,44	± 0,15	B	a	
90 DIAS	0,82	± 0,21	C	a	0,00	± 0,00	B	b	

* Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma coluna (ANOVA, Teste de Kruskal Wallis). Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma linha (Teste T de Student).

1.1.4. Hipoclorito de sódio 5,25%

Quando a solução de NaOCl 5,25% foi empregada, esta foi capaz de produzir inibição de crescimento bacteriano em todos os períodos (7, 14, 30, 60 e 90 dias) independente da temperatura de armazenamento, porém houve grande variação nos valores dos halos de inibição, o que mostra a instabilidade da solução. Além disso, halos menores foram observados para o NaOCl 5,25% quando armazenado a 37°C do que quando refrigerado (Tabela 3).

Tabela 3. Halos de inibição da solução de hipoclorito de sódio 5,25% de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento*.

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO								
	8°C				37°C			
INICIAL	3,87	± 0,51	BC	-	3,87	± 0,51	AB	-
7 DIAS	6,64	± 1,38	A	a	3,59	± 1,18	AB	b
14 DIAS	4,60	± 0,99	B	a	4,03	± 1,13	AB	a
30 DIAS	2,94	± 0,33	BC	a	4,93	± 1,16	A	a
60 DIAS	1,71	± 0,58	C	a	2,96	± 1,34	B	a
90 DIAS	2,93	± 0,62	C	a	0,65	± 0,49	C	b

* Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma coluna (ANOVA, Teste de Kruskal Wallis). Valores seguidos de letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em uma mesma linha (Teste T de Student).

1.1.5 Comparação da atividade antimicrobiana de todas as soluções testadas

As soluções de hipoclorito de sódio em baixa concentração (0,5% e 1%) recém-manipuladas e também as armazenadas em diferentes temperaturas e períodos de tempo não demonstraram ação antimicrobiana expressiva frente ao *E. faecalis*.

Para a solução de NaOCl a 2,5%, os maiores halos de inibição foram constatados após 7 dias de armazenamento sob refrigeração, com um decréscimo na sua efetividade com o passar do tempo. Quando armazenadas em temperatura de 37°C, um pico de ação foi observado em 60 dias, com pequena homogeneidade para os resultados, como demonstrado pelo elevado desvio-padrão.

As alíquotas de NaOCl 5,25% foram as responsáveis pelos maiores halos de inibição obtidos quando comparadas às outras soluções, demonstrando que soluções mais concentradas parecem ser mais efetivas quanto a sua ação antimicrobiana.

Para as soluções mais concentradas, as alíquotas das substâncias removidas em 7 e 14 dias foram as que promoveram maiores halos de inibição, demonstrando atividade antimicrobiana superior aos períodos posteriores de 30, 60 e 90 dias. Os dados sugerem que em períodos maiores de tempo há uma diminuição do potencial desinfetante das soluções cloradas.

1.2. Variação do pH

De acordo com o presente estudo, observou-se que as soluções de hipoclorito de sódio são alcalinas inicialmente e há uma tendência ao aumento do pH, para valores altamente alcalinos independentemente do tempo e das condições de armazenamento (**Tabela 4**).

Tabela 4. Média do pH das soluções de hipoclorito de sódio em diferentes períodos de tempo e condições de armazenamento.

	INICIAL		7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
NaOCl 0,5%	11,03	8°C	11,10	11,15	11,30	11,60	11,67
		37°C	11,20	11,56	11,29	11,69	11,00
NaOCl 1%	11,49	8°C	11,40	11,87	11,76	12,00	12,00
		37°C	11,30	11,89	11,99	12,00	12,00
NaOCl 2,5%	11,90	8°C	11,50	12,00	12,00	12,00	12,00
		37°C	11,30	12,00	12,00	12,00	12,00
NaOCl 5,25%	12,00	8°C	11,28	12,00	12,00	12,00	12,00
		37°C	11,40	12,00	12,00	12,00	12,00

2 AÇÃO ANTIMICROBIANA, PH E QUANTIDADE DE CLORO ATIVO EM SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO COLETADAS DE CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS NA CIDADE DE PIRACICABA

Das 30 amostras obtidas, 11 delas eram soluções de NaOCl 0.5%, 7 eram NaOCl 1.0%, 10 eram NaOCl 2.5% e apenas 2 eram NaOCl 5.25%. Foram abordados 15 Cirurgiões-Dentistas Clínicos Gerais e 15 Especialistas (10 Endodontistas). 90% (27/30) dos entrevistados relataram que armazenam as soluções em armário (temperatura ambiente) e apenas 10% armazenam em geladeira (3/30). De acordo com as informações

obtidas nos frascos, o período de validade indicado pelo fabricante abrange o período de 6 meses após a manipulação.

2.1 Soluções de Hipoclorito de Sódio Recém-Manipuladas (Controle)

Todos os testes foram realizados imediatamente após a obtenção das amostras, que segundo o fabricante, apresentam período de validade de 6 meses a partir do momento de sua fabricação. Assim, para podermos comparar a influência do armazenamento sobre a ação antimicrobiana, teor de cloro ativo e pH das soluções coletadas dos consultórios, utilizamos soluções de NaOCl recém-manipuladas, que serviram como controle. Estas foram avaliadas quanto ao pH, concentração de cloro ativo e ação antimicrobiana logo após a sua manipulação.

Observa-se um aumento da concentração de cloro ativo, ação antimicrobiana e pH à medida que as concentrações de hipoclorito de sódio se elevam de 0,5% a 5,25%.

Tabela 5. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH.

Solução	Cl ativo (mg/L)	HALO (mm)	pH
NaOCl 0.5%	10,8	0	11,03
NaOCl 1.0%	29,7	0,64	11,49
NaOCl 2.5%	56,7	1,35	11,90
NaOCl 5.25%	121,5	2,28	12,00

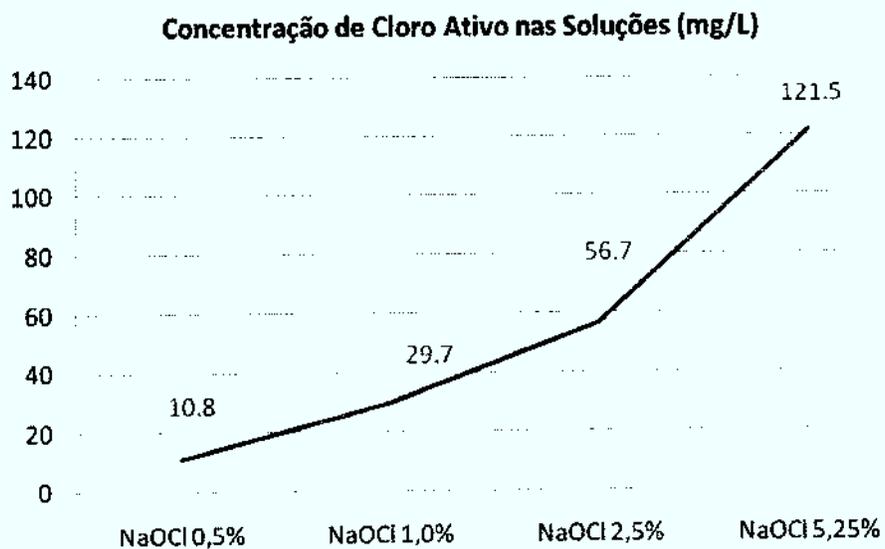


Gráfico 1. Média dos valores de concentração de cloro ativo (mg/L) nas soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.

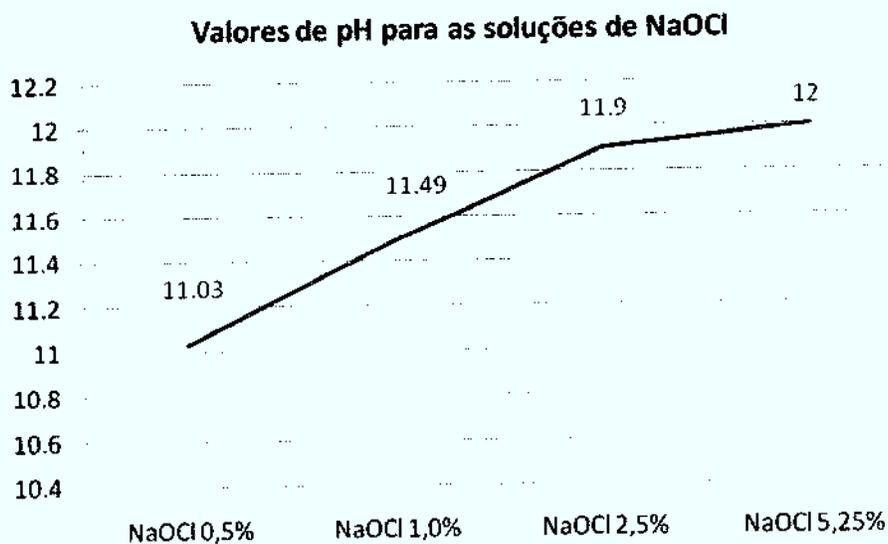


Gráfico 2. Média dos valores de pH das soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.

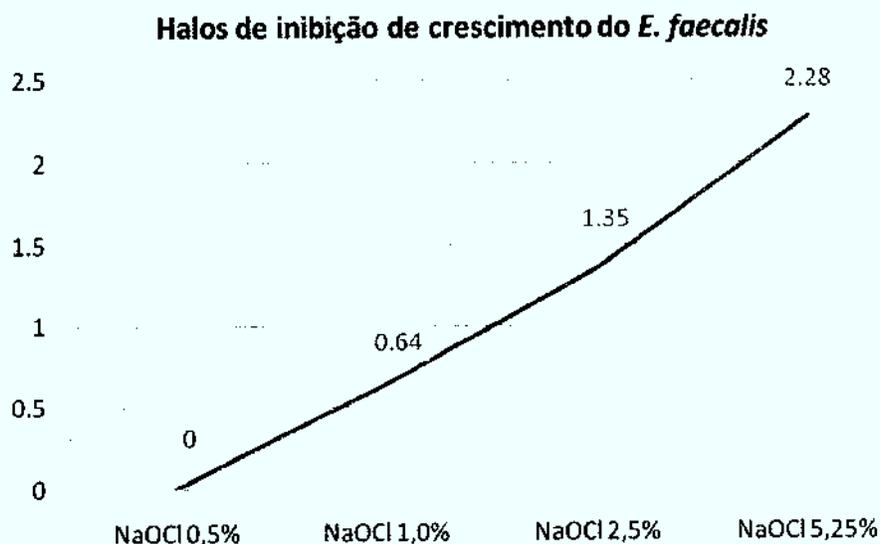


Gráfico 3. Média dos halos de inibição promovidos por soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.

2.2 Amostras coletadas de Hipoclorito de Sódio

2.2.1. Hipoclorito de Sódio 0,5%

Na solução controle a 0,5% verificou-se uma concentração de cloro ativo equivalente a 10,8 mg/L de solução e um pH de 11,03. Esta não foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo *E. faecalis*.

Todas as soluções de NaOCl 0,5% coletadas não foram capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis* e eram armazenadas em temperatura ambiente.

Não se observou correlação estatística significativa entre a concentração de a concentração de cloro ativo, pH e tempo decorrido de

fabricação para as soluções de NaOCl 0,5% coletadas (Teste de Pearson, $p < 0,05$). Os dados estão representados na **Tabela 6** e **Gráfico 4**.

O período de fabricação descrito na **Tabela 6** corresponde ao número de meses entre o momento de fabricação da solução, informado no frasco pelo fabricante, e o momento da coleta e execução dos testes. Observa-se, portanto, que apenas 1 de 11 soluções estava fora do período de validade indicado pelo fabricante, enquanto que oito delas já se apresentavam com 5 meses após o fabricação, indicando longos períodos de armazenamento.

Tabela 6. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 0,5% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

AMOSTRA	Cl ATIVO (mg/L)	HALO (mm)	pH	FABRICAÇÃO (meses)
Controle	10,8	0	11,03	-
1	0	0	8,73	5
2	0	0	7,94	12
3	0	0	8,37	1
4	2,7	0	8,32	5
5	5,40	0	8,72	5
6	5,40	0	8,67	5
7	8,10	0	9,53	5
8	8,10	0	8,70	5
9	10,8	0	9,10	4
10	10,8	0	8,41	5
11	10,8	0	8,47	5
Média	5,65	0	8,63	5
dp	4,43	0	0,42	3
Mediana	5,4	0	8,67	5
Máxima	10,8	0	9,53	12
Mínima	0	0	7,94	1

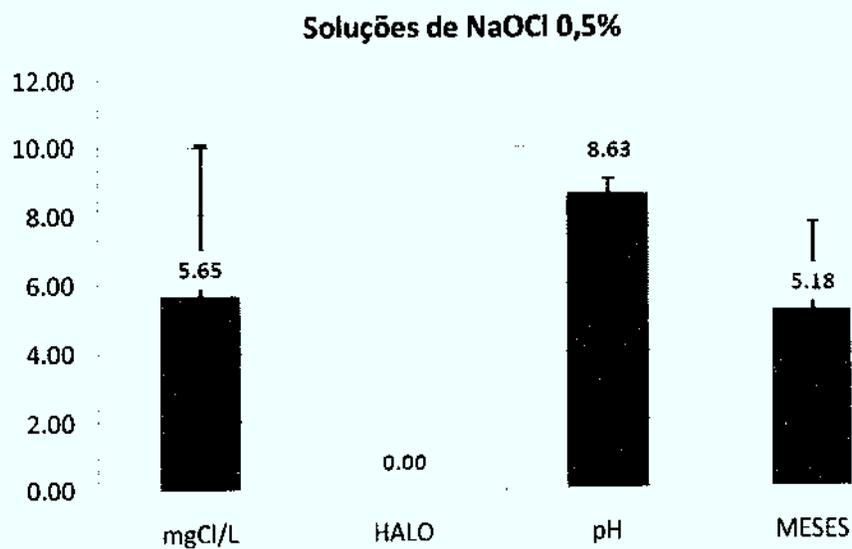


Gráfico 4. Médias e desvio-padrão dos valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

2.2.2. Hipoclorito de Sódio 1,0%

Na solução controle a 1% verificou-se uma concentração de cloro ativo equivalente a 29,7 mg/L de solução e um pH de 11,49. Esta produziu halos de inibição de crescimento bacteriano discretos, com valores de 0,64 mm. Todas as soluções de NaOCl 1% coletadas não foram capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis* e eram armazenadas em temperatura ambiente.

Não se observou correlação estatística significativa entre a concentração de a concentração de cloro ativo, pH e tempo decorrido de fabricação para as soluções de NaOCl 1,0% coletadas (Teste de Pearson, $p < 0,05$). Os dados estão representados na **Tabela 7** e **Gráfico 5**.

Observou-se que todas as soluções estavam dentro do período de validade indicado pelo fabricante, e duas delas estavam atingindo o tempo máximo de armazenamento.

Tabela 7. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 1% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

AMOSTRA	Cl ATIVO (mg/L)	HALO (mm)	pH	FABRICAÇÃO (meses)
Controle	29,7	0,64	11,49	0
1	2,7	0	7,98	6
2	5,4	0	9,35	1
3	5,4	0	11,04	1
4	8,1	0	9,15	6
5	8,1	0	9,25	1
6	8,1	0	9,95	2
7	13,5	0	8,74	2
8	43,2	0	10,89	3
Média	11,81	0	9,54	2,75
dp	13,06	0	1,04	2,12
Mediana	8,1	0	9,30	2
Máxima	43,2	0	11,04	6
Mínima	2,7	0	7,98	1

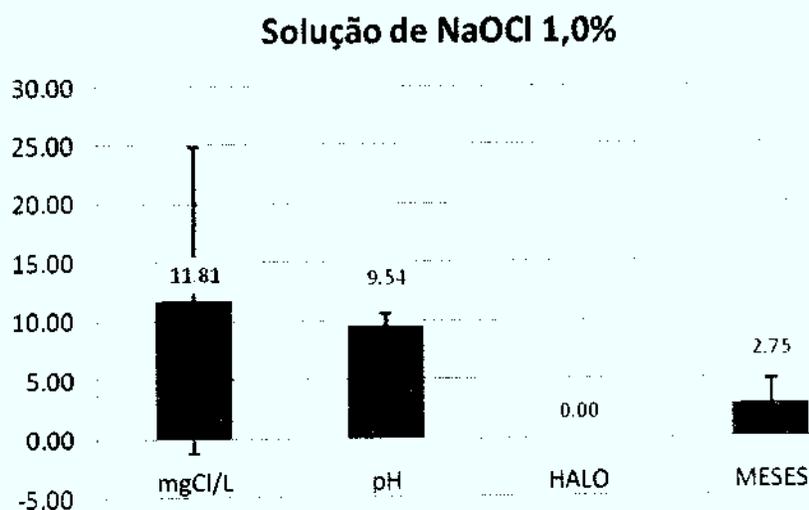


Gráfico 5. Médias e desvio-padrão dos valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 1% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

2.2.3. Hipoclorito de Sódio 2,5%

Na solução controle a 2,5% verificou-se uma concentração de cloro ativo equivalente a 56,7 mg/L de solução e um pH de 11,90. Esta produziu halos de inibição de crescimento bacteriano discretos, com valores de 1,35 mm.

Das 9 soluções de hipoclorito de sódio 2,5% coletadas, apenas 4 foram capazes de produzir halos de inibição de crescimento microbiano. Observaram-se valores superiores de concentração de cloro ativo nas soluções bem como de pH. No entanto, não foi possível estabelecer correlação estatística significativa entre a concentração de cloro ativo, pH e tempo decorrido de fabricação para as soluções de NaOCl 2,5% coletadas (Teste de Pearson, $p < 0,05$). Os dados estão representados na **Tabela 8** e **Gráfico 6**.

Tabela 8. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 2,5% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

AMOSTRA	Cl ATIVO (mg/L)	HALO (mm)	pH	FABR. (meses)
Controle	56,7	1,35	11,9	0
1	2,7	0	8,75	3
2	10,8	0	11,93	1
3	13,5	0	8,93	4
4	40,5	0	11,68	1
5	54	2,26	11,91	6
6	62,1	0	9,57	7
7	62,1	1,35	9,81	3
8	86,4	0	11,77	3
9	86,4	1,34	12	1
Média	46,50	10,71	0,55	3
dp	31,71	1,40	0,87	2
Mediana	54	11,68	0	3
Máxima	86,4	12	2,26	7
Mínima	2,7	8,75	0	1

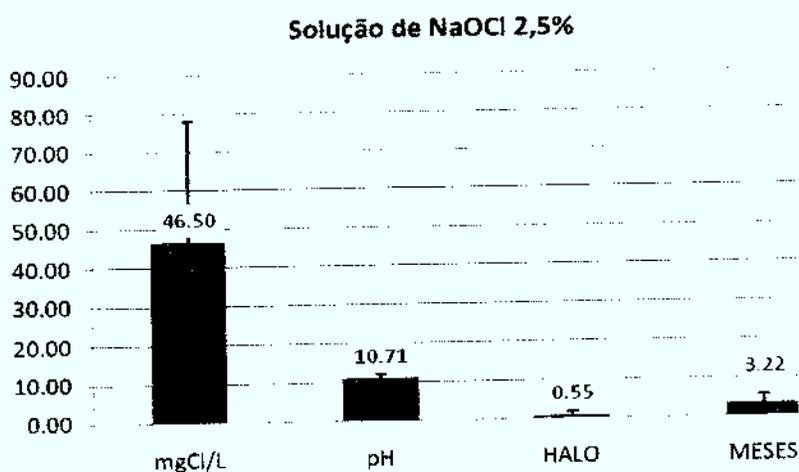


Gráfico 6. Médias e desvio-padrão dos valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras de NaOCl 2,5% coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

2.2.4. Hipoclorito de Sódio 5,25%

Na solução controle a 5,25% verificou-se uma concentração de cloro ativo equivalente a 121,5 mg/L de solução e um pH de 12,00. Esta produziu halos de inibição de crescimento bacteriano discretos, com valores de 2,28 mm.

Foram coletadas apenas 2 soluções de hipoclorito de sódio 5,25%, e ambas demonstraram ação antimicrobiana, altos valores de pH e grandes concentrações de cloro ativo. Os dados estão representados na **Tabela 9**.

As soluções testadas estavam dentro do período de validade, considerando o número de meses decorridos do momento de sua fabricação, demonstrando ser efetivas frente ao *E. faecalis*, apresentando altos valores de cloro ativo e pH.

Tabela 9. Valores de cloro ativo, halo de inibição, pH e dados de fabricação para as amostras coletadas de consultórios odontológicos na cidade de Piracicaba (SP, Brasil).

AMOSTRA	CI ATIVO (mg/L)	HALO (mm)	pH	FABRICAÇÃO (meses)
Controle	121,5	2,28	12	0
1	89,1	3,23	11,63	4
2	110,7	6,85	12	3

DISCUSSÃO

O *Enterococcus faecalis* foi o microrganismo de escolha para o presente estudo por possuir uma considerável resistência a substâncias químicas auxiliares comumente utilizadas em endodontia além de estar freqüentemente associado à presença de lesões periapicais persistentes e insucesso no tratamento endodôntico (Hancock *et al.*, 2001, Love 2001, Pinheiro *et al.*, 2003). É um microrganismo anaeróbio facultativo, relativamente fácil de ser cultivado e de alta relevância clínica. É uma espécie bacteriana capaz de se estabelecer e sobreviver na ausência de outras bactérias, em casos de dentes com necessidade de retratamento, na presença de lesões periapicais (Pinheiro *et al.* 2003). Encontram-se disponíveis na literatura vários estudos avaliando a efetividade de substâncias auxiliares frente ao *E. faecalis* tornando, assim, possível a comparação dos nossos resultados a outros já relatados.

O teste de difusão em Agar permite uma padronização da densidade do inóculo microbiano, garantindo o crescimento homogêneo dos microrganismos em toda a superfície e interior do Agar (Tobias, 1988). O resultado é obtido através do tamanho das zonas de inibição. Os fatores limitantes da técnica são a capacidade de dissociação das substâncias e sua difusão através do Agar. No presente estudo, como foram utilizadas soluções de diferentes concentrações da mesma substância, este fator não relevante.

De acordo com os resultados imediatos, observou-se que quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio, maior a ação antimicrobiana da mesma. Os resultados sugerem que quando as soluções são armazenadas em temperatura de 37°C há uma tendência à redução do poder antimicrobiano das mesmas, sugerindo o início de um processo degradativo. Autores como Pappalardo *et al.* (1986) e Piskin *et al.* (1995) relatam ainda que soluções mais concentradas apresentaram rápida

decomposição a 24°C, o que não ocorreu para soluções menos concentradas. No entanto, menores alterações foram observadas quando as soluções foram armazenadas a 8°C, concordando com os resultados de Hoffman *et al.* (1991), onde o armazenamento a 4°C foi capaz de manter as soluções estáveis por até 2 anos.

Embora Vianna & Gomes (2009) relatem um halo de inibição de 0,3 mm relacionado a solução de hipoclorito de sódio 1,0% frente ao *E. faecalis*, este valor é bastante baixo tornando seu potencial antimicrobiano bastante crítico, concordando com nossos resultados.

De acordo com Bystrom & Sundqvist (1983) soluções de NaOCl 0,5% demonstram baixo potencial citotóxico. No entanto, Vianna *et al.* (2004) demonstraram que soluções de hipoclorito de sódio 0,5% e 1% necessitaram tempos superiores a 30 minutos para eliminar *E. faecalis* e *C. albicans*, quando em contato direto no meio líquido. Observou-se que, frente a microrganismos resistentes, o hipoclorito de sódio em baixas concentrações demonstra ser ineficaz, independentemente de sua condição de armazenamento. Diante disso, observamos que seu efeito antimicrobiano é pequeno, sendo preferível a utilização as soluções de NaOCl com maiores concentrações.

Quando armazenadas a 8°C, as soluções de NaOCl 2,5% produziram halos de inibição maiores nos primeiros 14 dias. Ao ser armazenada a 38°C halos de inibição menores foram observados, no entanto pico de ação antimicrobiana foi constatado aos 30 e 60 dias. Segundo Piskin (1995), embora as soluções de hipoclorito de sódio apresentem data de validade correspondente a períodos inferiores a 2 anos desde a data de fabricação, a estabilidade do hipoclorito pode ser adversamente afetada por vários fatores.

Os resultados de nosso estudo concordam com os de Ansel *et al.* (2000) e Vianna *et al.* (2004), pois se observou que o potencial antimicrobiano das soluções de NaOCl esteve associado a sua concentração, onde maiores concentrações foram mais efetivas frente

ao *Enterococcus faecalis*. Gomes *et al.* (2005) demonstraram ainda que o NaOCl 5,25% foi capaz de eliminar microrganismos presentes em cones de guta-percha rapidamente.

Para os períodos de 7 e 14 dias, as alíquotas de NaOCl 1%, 2.5% e 5.25% resfriados promoveram valores de atividade antimicrobiana superior aos obtidos no período inicial, ou seja, aqueles obtidos logo após a manipulação do produto. Nossos valores iniciais de inibição de crescimento foram superiores aos obtidos por Vianna & Gomes (2009) para as mesmas soluções, frente ao mesmo microrganismo. Embora a técnica seja padronizada, variáveis não-identificadas relacionadas à característica da solução manipulada ou mesmo à temperatura de armazenamento poderiam influenciar os valores obtidos no período inicial.

Pappalardo *et al.* (1986) e Piskin & Turkun (1995), relatam que as soluções de hipoclorito de sódio mais concentradas apresentam rápida decomposição. Os resultados do presente estudo sugerem um processo degradativo mais intenso quando as mesmas são armazenadas em temperatura de 37°C. Há, portanto, uma tendência à redução do seu poder antimicrobiano. Mesmo as soluções armazenadas a 8°C demonstraram-se instáveis. No entanto, o resfriamento das mesmas pode preservar por mais tempo sua ação antimicrobiana.

Assim, há uma grande instabilidade das soluções avaliadas, tanto daquelas armazenadas em ambiente laboratorial quanto daquelas obtidas de consultórios odontológicos. Valores inferiores de degradação são observados quando as soluções mais concentradas são armazenadas em geladeira, por períodos breves, não superiores a 15 dias, demonstrando valores superiores para os halos de inibição.

Dychdala (1991) relata que quando em pH básico, as soluções de hipoclorito de sódio demonstram maior capacidade de preservação. Dychdala (1991) e Piskin & Turkun (1995) indicam ainda que o pH deve ser sempre superior a 9.0 para que a solução apresente suas propriedades inerentes. Lopes & Siqueira (2004) relatam que o pH acima de 10 mantém a

estabilidade das soluções de NaOCl. Em nosso estudo, valores de pH superiores a 9 foram obtidos para a maioria das amostras, no entanto, várias delas, principalmente em baixas concentrações não foram capazes de produzir ação antimicrobiana. Ainda, constatou-se que as soluções de hipoclorito de sódio são alcalinas inicialmente e há uma tendência ao aumento do pH, para valores altamente alcalinos independentemente do tempo e das condições de armazenamento, como demonstrado na tabela 9. Sugere-se que não há correlação entre valores de pH e poder antimicrobiano nas soluções de hipoclorito de sódio.

Um dos fatores que podem sugerir alteração e degradação de soluções de hipoclorito de sódio é a concentração de cloro ativo. Há uma tendência em discutir a estabilidade química das soluções de hipoclorito de sódio, principalmente no que tange há sua forma de armazenamento após a manipulação. Alguns relatos publicados demonstram altas taxas de decomposição, ocorrendo perda acima de 70% de cloreto disponível (Pappalardo *et al.*, 1986; Gambarini *et al.*, 1998). Este fato poderia explicar a ausência de ação antimicrobiana nas soluções de hipoclorito de sódio a 0,5%; 1% e 2,5% utilizadas nos consultórios odontológicos. Devido a sua alta concentração, sugere-se que a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% é capaz de manter suas propriedades antimicrobianas por períodos mais longos de tempo. Clarkson *et al.* (2001) sugerem que a concentração de cloro das soluções poderia ser preservada se as soluções de hipoclorito de sódio fossem armazenadas em recipientes fechados e opacos, pois a abertura constante dos recipientes favorece a perda do cloreto ativo.

A ação antimicrobiana limitada das soluções coletadas pode ainda estar relacionada ao tempo de armazenamento e a sua não-renovação constante do arsenal de substâncias presentes no consultório odontológico, concordando com os relatos de Clarkson *et al.* (2001). No entanto, Gambarini *et al.* (1998) constataram que perdas iguais a 1% no teor de cloro ativo são observadas para amostras armazenadas aquecidas ou não, em períodos de 30 dias. Johnson & Remeikis (1993) relatam ainda que a

habilidade de dissolução do tecido de hipoclorito de sódio a 5,25% permaneceu estável por pelo menos 10 semanas, quando o armazenamento em recipientes translúcido, hermético, e não reativos. O autor salienta a necessidade de descarte da solução após este período.

Observa-se na literatura resultados bastante conflitantes para a ação antimicrobiana, presença de cloro ativo e pH das soluções de hipoclorito de sódio, considerando condições de armazenamento e períodos diferentes de tempo. A instabilidade das soluções cloradas demonstra assim a necessidade de sua constante renovação, e aquisição constante e em frascos com pequenos volumes, para que suas propriedades possam ser utilizadas de forma mais completa.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados do presente estudo e suas limitações, foi possível concluir que:

1. As soluções de hipoclorito de sódio em suas diferentes concentrações demonstram ser bastantes instáveis independente de sua concentração, modo e tempo de armazenamento.
2. A solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, quando dentro do período de validade indicado pelo fabricante, apresenta maior ação antimicrobiana, embora apresente um decréscimo nesta propriedade à medida que o tempo avança.
3. Verificou-se que o pH parece não ser um fator determinante na ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio, uma vez que é possível constatar um aumento de pH com o tempo e uma diminuição da ação antimicrobiana.
4. Os dados obtidos a partir de soluções armazenadas em condições laboratoriais e daquelas utilizadas em consultórios odontológicos sugerem que as soluções cloradas devem ser adquiridas em menores quantidades e renovadas periodicamente, em curto espaço de tempo.
5. É necessário explorar em pesquisas futuras, fatores adicionais que possam influenciar na ação das soluções cloradas, tais como sua exposição ao oxigênio e características dos frascos empregados para o seu armazenamento.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects off temperature, concentration, and tissue type on ability of sodium hipochlorite. J Endod. 1981; 7(8): 376-7.
2. Ansel HC, Popovich NG, Allen LV. Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. São Paulo: Premier, 2000.
3. Baker NA, Eleazer PD, Auerbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. J Endod. 1975; 1(4): 127-135.
4. Barbin EL. Estudos *in vitro* do efeito da adição de lauril-dietilenoglicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino. (Dissertação de Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1999, 108p.
5. Berutti E, Marini R. A scanning electron microscopic evaluation of the debridment capability of sodium hypochlorite at different temperatures. J Endod. 1996; 22(9): 467-70.
6. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. J Appl Bacteriol. 1979; 46(1): 65-73.
7. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surgery. 1983; 55(3): 307-12.
8. Clarkson RM, Moule AJ, Podlich HM. The shelf-life of sodium hypochlorite irrigating solutions. Aust Dent J. 2001; 46(4): 269-76.

9. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS: Disinfection, sterilization and preservation. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 133-5.
10. Estrela CRA. Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares. (Dissertação de Mestrado). Goiânia: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás; 2000. 108 p.
11. Estrela, C. Ciência Endodôntica. São Paulo: Artes Médicas; 2004.
12. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. Scand J Dent Res. 1982; 90(2): 134-40.
13. Fairbanks DCO. Avaliação da capacidade quelante do EDTA, do EDTAC e do EDTA- T pela análise da microdureza da dentina radicular. (Tese de Mestrado) Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro; 1995, 82 p.
14. Fraiss S, Ng Y-L, Gulabivala K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. Int Endod J. 2001; 34(1): 206-15.
15. Gambarini G, De Luca M, Gerosa R. Chemical stability of heated sodium hypochlorite endodontic irrigants. J Endod. 1998; 24(6): 432-4.
16. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and polymerase chain reaction analysis. Oral Med Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102(2): 247-253.
17. Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. (Tese de Doutorado). Manchester, UK: University of Manchester; 1995.
18. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Clinical significance of dental root canal microflora. J Dent. 1996a; 24(1): 47-55.

19. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Variations in the susceptibilities of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996b; 29(4): 235-241.
20. Gomes BPFA, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi VPS, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(4): 512-7.
21. Grossman LI, Meiman BW. Dissolution of pulp tissue by chemical agents. *J Am Dent Assoc.* 1941; 28(n): 223-5.
22. Hancock III HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacterial isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 579-586.
23. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod.* 1978; 4(2):60-4.
24. Harrison JW, Wagner GW, Henry CA. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. *J Endod.* 1981; 16(7): 128-132.
25. Hoffman PN, Death JE, Coates D. The stability of sodium hypochlorite solutions. In: Collins CH, Allwood MC, Bloomfield SF, Fox A, eds. *Disinfectants: Their use and evaluation of effectiveness.* London: Academic Press; 1991, p.77-83.
26. Holland R, Soares IJ, Soares IM. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dog's teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol.* 1992; 8(6): 223-229.
27. Johnson BR, Remeikis NA. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. *J Endod.* 1993; 19(1): 40-43.

28. Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* ssp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005; 31(12): 851-6.
29. Koskinen KP, Stenvall H, Uitto VJ. Dissolution of bovine pulp tissue by endodontic solutions. *Scand J Dent Res*. 1980; 88(5): 460-11.
30. Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia – Biologia e técnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
31. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001; 34(5): 399-405.
32. Muora MS. Estudo in vitro de efeito antimicrobiano do laser de ER:YAG em canais radiculares infectados. (Dissertação de Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2003, 100p.
33. Nicoletti MA, Magalhães JF. Influence of the container and environmental factors in the stability of sodium hypochlorite. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1996; 121(4): 301-9.
34. Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: Bases para a prática clínica*. São Paulo: Artes Médicas; 1991.
35. Pappalardo G, Tanner F, Roussianos D, Pannatier A. Efficacy and stability of two chlorine-containing antiseptics. *Drugs Exp Clin Res*. 1986; 12(11): 905-9.
36. Pécora JD, Murgel CA, Guimarães LF, Costa WF. Determination of active chlorine in differential commercial brands of Dakin's solutions. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1988; 2(1): 10-3.
37. Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela C. Soluções auxiliares do preparo do canal radicular. In: Estrela C, Figueiredo JAP. *Endodontia: princípios biológicos e mecânicos*. São Paulo: Artes Médicas; 1999, p. 553-69.

38. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1): 1-11.
39. Piskin B, Turkun M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J Endod.* 1995; 21 (2): 253-5.
40. Sabala CL, Powell SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissue. *J Endod* 1989; 15(10):490-2.
41. Santos TC. Estudos *in vitro* do aumento da temperatura das soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar do bovino. (Dissertação de Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1999, 108 p.
42. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dental Clin North Am.* 1974; 18(2): 269-96.
43. Senia ES, Macarro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L. Rapid sterilization of gutta-percha cones with 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 1975; 1(4):136-40.
44. Shih M, Marshall FJ, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1970; 29(4): 613-9.
45. Siqueira JF Jr, Araújo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod.* 1997; 23(8): 499-502.
46. Siqueira JF Jr, Moraes SR, Lopes HP. Atividade antimicrobiana das águas sanitárias disponíveis no mercado nacional. *RBO* 1999; 56(2): 57-60.

47. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997; 30(2): 91-95.
48. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992; 18(9): 427-430.
49. Sundqvist G, Fidgor D, Sjogren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998; 85(1): 86-93.
50. Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J.* 1988; 21(2): 155-60.
51. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1): 79-84.
52. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(4):585-9.